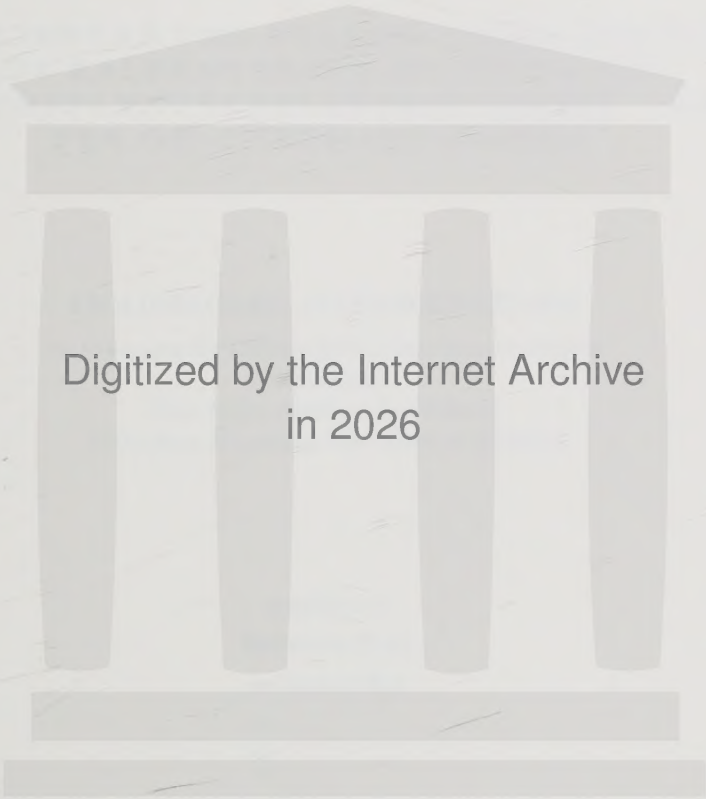
ISOLIERUNG UND ANALYSE EINES PEPTIDS AUS KALBSMYOCARD MIT HILFE DER HOCHSPANNUNGSELEKTROPHORESE UND DER GELCHROMATOGRAPHIE

Reinhard Bubl

1972


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0017

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

ISOLIERUNG UND ANALYSE EINES PEPTIDS AUS KALBSMYOCARD MIT HILFE DER HOCHSPANNUNGSELEKTROPHORESE UND DER GELCHROMATOGRAPHIE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
REINHARD BUBL
aus Simbach/Inn

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Nowy
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Seitz
Dekan:	Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 11. 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINEN ELTERN GEWIDMET

GLIEDERUNG

EINLEITUNG

1. METHODE
1.1 Sektion und Preparation des Herzens
1.2 Trennmethoden
1.2.1 Elektrophorese
1.2.2 Gelfiltration
1.3 Färbungen
1.4 Elutionsverfahren
1.5 Hydrolyse

2. ERGEBNISSE
2.1 Lokalisierung der zu isolierenden Substanz
2.2 Isolierung der Substanz G durch Hochspannungselektrophorese
2.3 Gelfiltration
2.4 Überprüfung der bei pH 3,6 reinen Substanz G bei pH 1,9
2.5 Ergebnis der Hydrolyse

3. DISKUSSION
3.1 Methode
3.1.1 Vorteile der Anwendung von zwei verschiedenen Trennmethoden
3.1.2 Reihenfolge der angewandten Methoden
3.1.3 Erklärung der Auftrennung des bei pH 3,6 einheitlichen Bandes durch die Elektrophorese bei pH 1,9
3.2 Diskussion des Ergebnisses

4. ZUSAMMENFASSUNG

ABBILDUNGEN

LITERATUR

EINLEITUNG

Die meisten Untersuchungen über die ninhydrinpositive Fraktion von enteiweißten Extrakten befassen sich hauptsächlich mit dem Aminosäurespektrum der Organe. Über niedermolekulare Peptide enthalten sie keine oder nur allgemeine Aussagen, z. B. wurde die Veränderung des Aminosäuregehalts vor und nach der Hydrolyse bestimmt. (3) CLOTTEN (4) untersuchte nicht mehr nur die Eigenschaften des Gesamtextrakts, sondern hochspannungselektrophoretisch isolierte Peptidfraktionen. Uns war nun die Aufgabe gestellt, aus der Fraktion der bei pH 3,6 anodisch wandernden sauren Peptide eines zu isolierenden und die an seinem Aufbau beteiligten Aminosäuren so weit als möglich zu bestimmen.

1. METHODE

1.1 Sektion und Preparation des Herzens

Aus Kälbern wurden sofort nach der Schlachtung die Herzen so entnommen, daß die Gefäße, ungefähr 3 cm vom Herzen entfernt, durchschnitten wurden. Wir gaben sie sofort in ein Gefäß mit warmer (37 Grad C) Tyrodelösung, dabei reinigten sich die Ventrikel und Vorhöfe durch die noch bestehende Eigenkontraktion, unterstützt durch manuelle Herzmassage, von Blutresten. Um auch aus den Gefäßen des Herzmuskels das Blut zu entfernen, wurde in den Aortenstumpf ein Schlauch eingebunden, der mit einem Gefäß mit Tyrodelösung (ebenfalls 37 Grad C) verbunden war. Durch Heben des Gefäßes über Herzniveau wurden die Koronarien so lange perfundiert, bis nur mehr klare Spülflüssigkeit abfloß. Alle diese Vorgänge mußten sehr schnell durchgeführt werden, um die postmortalen Veränderungen im Myocard möglichst gering zu halten. Diesem Zweck diente auch die anschließende Einfrierung des Herzens bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff. Dazu mußten die Herzen soweit aufgetaut werden, daß sie eben schneidbar waren. Das subepicardiale Fettgewebe und die Gefäßstümpfe wurden entfernt, danach die Vorhöfe von den Ventrikeln abgetrennt. Zur Homogenisierung – im eisgekühlten Gefäß – zerkleinerten wir die Ventrikelmuskulatur und versetzten sie im Gewichtsverhältnis 1:2 (Muskulatur : Wasser) mit Aqua dest. Danach mußte das Homogenat zur Extraktion 18 Stunden im Kühlschrank stehen. Nach dieser Zeit konnte eine Schicht aus Fett und Bindegewebsteilchen abpipetiert und verworfen werden. Der Rest wurde bei 3500 rpm bei 0 Grad C 15 min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und aufbewahrt, das Sediment mit gleichen Teilen destillierten Wassers versetzt, mit einem Glasstab aufgerührt und erneut zentrifugiert. Den Überstand schüttete man zum im ersten Schritt Gewonnenen. Das Sediment verwarfen wir. Um den Überstand noch von feinstem Sediment zu befreien, mußte er noch bei 28 000 rpm bei 0 Grad C 120 min. ultrazentrifugiert werden.

Zur Abtrennung der hochmolekularen Bestandteile des Extrakts schloß sich die Ultrafiltration an. Auf ein Kunststoffgerippe wurde der vorher in entsprechender Länge geschnittene und in Aqua dest. getauchte Dialyseschlauch (LKB-Ultrafilter 6300 der Firma LKB Producter AB) gezogen. Das untere Ende wurde verknotet, das obere durch einen Gummistöpsel mit einem Anschlußstück für die Wasserstrahlpumpe luftdicht verschlossen. Den Dialyseschlauch tauchten wir in einen Meßkolben, der mit dem Überstand

der Ultrazentrifugation gefüllt war. Nun wurde im Dialyseschlauch mit einer Wasserstrahlpumpe ein Unterdruck erzeugt. Das ganze System mußte mit Eiswasser gekühlt werden. Durch den Ultrafilter können nur Teilchen bis zu einem Molekulargewicht von 30 000 in das Innere gelangen. Wir beendeten die Ultrafiltration, sobald die Eiweißkonzentration 4 g % (Photometrische Bestimmung mit Hilfe der Biuretfärbung) erreicht war.

Das schonendste Verfahren das ultrafiltrierte Material vor Veränderungen zu bewahren, ist die Gefriertrocknung. Nachdem wir diese durchgeführt hatten, wurde die lyophilisierte Substanz in Reagenzgläser abgefüllt, gut verschlossen (Material ist stark hygroskopisch) und im Eisschrank aufbewahrt.

Aus 1 g Herzgewebe erhält man etwa 10 mg Trockenstubstanz.

1.2 Trennmethoden

1.2.1 Elektrophorese (4)

Die Hochspannungselektrophorese wurde an einem Apparat, nach Zillig, der Firma Hölzel, durchgeführt. Dieser ist durch folgende Betriebsgrößen charakterisiert: Die Spannung kann von 0—10 kV variiert werden, die maximale Leistung beträgt 400 Watt. Die Trennkammer hat folgende Ausmaße: 45x100 cm.

Als Trägermaterial verwandten wir gewaschenes Papier von Schleicher und Schüll Nr. 2043 b Mgl. Das Papier wurde entsprechend der Länge der Trennkammer geschnitten und, nachdem die Auftragsstelle mit Bleistift markiert worden war, in eine Wanne mit Puffer gegeben, wo es bis zur vollständigen Durchtränkung blieb. Vom herausgenommenen Papierstreifen wurde der überschüssige Puffer mit Filterpapier abgetrocknet. Wir verwandten folgende Puffer:

pH 1,9 (zur Auftrennung der neutralen Aminosäuren)

Essigsäure	Ameisensäure	Wasser
120	26	854

pH 3,6 (1. zur Isolierung der Substanz G;
2. zur Identifizierung der sauren Aminosäuren;
3. in Kombination mit Puffer pH 1,9 zur Identifizierung der basischen Aminosäuren)

Essigsäure	Pyridin	Wasser
100	10	890

Zum Auftragen der Substanzen auf das Papier verwandten wir Pipetten, die aus einem Kunststoffschlauch von ungefähr 1 mm Durchmesser gefertigt waren. Damit sich kein Material in die Filterpapierunterlage saugte, mußte die Auftragsstelle von dieser abgehoben werden. Über Fehlermöglichkeiten und ihre Vermeidung siehe CLOTTEN (4).

1.2.2 Gelfiltration (6, 11)

Die Gelfiltration war ein weiteres Trennverfahren. Sie wurde in einem Sephadex-Chromatographierohr K 9/60 (0,9×60 cm), das mit Sephadex G-10 gefüllt war, durchgeführt. Da es sich um niedermolekulare Substanzen handelte, verwandten wir das Gel G-10. Die Chromatographiesäule samt Füllung stand uns bereits gebrauchsfertig zur Verfügung. Sephadex G-10 und das Chromatographierohr stammten von der Firma Pharmacia Fine Chemicals Uppsala. Bevor wir das zu trennende Substanzgemisch durch die Säule laufen ließen, wurde diese mit dem Durchflußmittel — destilliertes Wasser — sechs Stunden vorgewaschen. Das Material wurde in einer Saccharoselösung aufgelöst und damit die Säule beschickt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10,8 ml pro Stunde. Die Trennung wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Ein Durchflußanalysator (UV-Photometer 254 mμ verbunden mit einem Punktschreiber) bestimmte die Extinktion des Ausflusses aus der Säule und zeichnete sie auf. Das Filtrationsergebnis wurde von einem Fraktionssammler in 42 Einzelfraktionen unterteilt. Diese Apparate stammten von der Firma Colora Meßtechnik.

1.3 Färbungen

Die Pherogramme wurden bei Zimmertemperatur getrocknet und mit 0,3 % Ninhydrinlösung gefärbt:

1,5 g Ninhydrin, 496 ml Aceton, 2 ml Eisessig, 2 ml Pyridin. Zur Fixierung der Farbe eignet sich folgende Lösung: 1 g Ninhydrin, 0,5 g Kobaltchlorid und 250 ml Isopropylalkohol.

1.4 Elutionsverfahren

Um die genaue Position des zu isolierenden Bandes zu erhalten, wurde nach durchgeführter Elektrophorese auf beiden Seiten des getrockneten Trägerpapiers ein Streifen, auf dem noch 1 cm der Auftragsstelle zu sehen war, abgeschnitten. Die Streifen wurden mit Ninhydrin gefärbt und wieder aufgeklebt. Da auf ihnen die gesuchte Substanz leicht lokalisiert werden

konnte, war damit auch der Verlauf des Bandes mit der Substanz auch im ungefärbten Papier zu ermitteln und es konnte ausgeschnitten werden.

In ein mit Aqua dest. gefülltes Gefäß hängten wir einen 10 cm breiten Streifen gewaschenen Elektrophoresepapiers, das ungefähr 5 cm über den Rand ragte. Dadurch konnte aus dem Gefäß Wasser angesaugt werden. Am freien Ende hängten wir den zu eluierenden Papierstreifen auf, der sich auch mit Wasser vollsaugte, das schließlich in einen Kolben abtropfte. Damit wurde die im Papier enthaltene Substanz ausgewaschen. Jeder Streifen wurde nach dem Eluieren zur Kontrolle der Vollständigkeit des Auswaschvorgangs mit Ninhydrin gefärbt.

1.5 Hydrolyse (4, 12, 5)

Wir führten eine saure Hydrolyse durch: Zur hydrolisierenden Substanz gaben wir im Überschuß 6n-HCl und erhitzten dieses Gemisch 48 Stunden lang bei 160° C im Rückflußkühler.

Verluste an einzelnen Aminosäuren und Fehlerquellen der sauren Hydrolyse werden in der Arbeit von Rees (13) aufgezeigt.

2. ERGEBNISSE

2.1 Lokalisierung der zu isolierenden Substanz

Aus dem nach der oben beschriebenen Methode hergestellten lyophilisierten Extrakt aus Kalbsmyocard wurde eine 10 % Lösung hergestellt. Um eine genaue Lokalisierung des zu isolierenden Bandes zu erreichen, wurde mit der Extraktlösung ein Pherogramm bei pH 3,6 hergestellt (6 kV, 50 mA, Laufzeit 3 Stunden). Zum Vergleich trugen wir bereits bekannte Substanzen, die auch bei pH 3,6 anodisch wandern, auf: Glutaminsäure, reduziertes Glutathion, oxydiertes Glutathion, Asparaginsäure. Die zu isolierende ninhydrinpositive Substanz liegt zwischen Glutaminsäure und reduziertem Glutathion. Wir nannten sie Substanz G. (Abb. 1).

2.2 Isolierung der Substanz G durch Hochspannungselektrophorese bei pH 3,6

Nachdem die Position der Substanz G genau bekannt war, fertigten wir 20 Pherogramme an, indem wir den 10 % Kalbsherzextrakt über die

gesamte Breite eines Elektrophoresepapiers auftrugen. Die Auftrennung wurde bei einer Spannung von 6 kV durchgeführt; die Stromstärke betrug zwischen 45 und 50 mA, die Laufzeit 3 Stunden. Aus den Blättern wurden die Streifen ausgeschnitten, die die Substanz G enthielten. Diese wurde eluiert und das Eluat gefriergetrocknet.

Anschließend erfolgte die Überprüfung des Reinheitsgrades: Das lyophilisierte Material wurde in 0,5 ml Aqua dest. aufgelöst. Davon entnahmen wir 0,03 ml zu einer erneuten Elektrophorese bei pH 3,6, bei einer Spannung von 5 kV und einer Trenndauer von 150 min. Zur Orientierung trugen wir gleichzeitig 10 % Kalbsherzextrakt auf. Es zeigten sich nach der Ninhydrinfärbung 2 schwache Bänder: eines im Bereich der neutralen Aminosäuren und eines auf der Höhe von Glutathion; sehr stark färbte sich als drittes Band die Substanz G an (Abb. 2). Nach Feststellung dieser Verunreinigung war zu entscheiden, ob die unbekannte Substanz aus dem vorgereinigten Material durch eine neue Methode oder durch Wiederholung der Elektrophorese isoliert werden könnte. Wir führten als nächsten Schritt eine Gelfiltration durch.

2.3 Gelfiltration

Es wurde deshalb eine Chromatographiesäule, die mit Sephadex G-10 gefüllt war, mit dem Substanzgemisch aus dem vorherigen elektrophoretischen Trennungsschritt beschickt. In 280 min. flossen 36,56 ml Durchflußmittel durch die Säule.

Der Durchlaufanalysator schrieb eine Kurve auf, die sich aus vier Gauß'schen Verteilungskurven zusammengesetzt denken läßt (Abb. 3). Wir ordneten diesen Kurven 4 Fraktionsgruppen im Fraktionssammler zu:

Gruppe I	Gläschen 16, 17, 18,
Gruppe II	Gläschen 19, 20, 21,
Gruppe III	Gläschen 22, 23,
Gruppe IV	Gläschen 24, 25.

Die Gläschen der einzelnen Gruppen wurden zusammengegossen und gefriergetrocknet.

Zur Erfolgskontrolle der Gelfiltration führten wir eine Elektrophorese bei pH 3,6 mit 5 kV und einer Laufzeit von 3 Stunden durch. Es wurden abwechselnd mit 10 % Kalbsherzextrakt die Gruppen I mit IV aufgetragen. Es zeigte sich dabei folgendes Ergebnis: In den Fraktionen 16–18 finden

sich schwache Bänder sowohl im Bereich der Substanz G als auch bei Glutathion, 19–21 enthielten die reine Substanz G in starker Konzentration, in den Fraktionen 22, 23 war sie in sehr schwacher Konzentration, in 24, 25 konnte keine ninhydrinpositive Substanz mehr nachgewiesen werden. Aus dem Verhalten von Substanz G zu Glutathion kann man schließen, daß das Molekulargewicht der unbekannten Substanz etwa dem von Glutathion entspricht (11) (Abb. 4).

2.4 Überprüfung der bei pH 3,6 reinen Substanz G bei pH 1,9

Um auszuschließen, daß mehrere Substanzen ein bei pH 3,6 einheitliches Band bilden, ließen wir eine Elektrophorese bei pH 1,9 mit 0,03 ml der Fraktionsgruppe II gemeinsam – zur Orientierung – mit 10 % Kalbsherzextrakt laufen. Es zeigten sich dabei 5 schwache Bänder, teilweise auf der Höhe von Aminosäuren (Glutaminsäure) und ein sehr starkes Band (Abb. 5). Es war uns zunächst unerklärlich, daß diese Substanzen weder durch die Gelchromatografie abgetrennt wurden, noch bei der Elektrophorese bei pH 3,6 nachgewiesen werden konnten. Wir glaubten zunächst an eine Verunreinigung. Wir stellten deshalb aus dem Restmaterial der Fraktionsgruppe II drei Elektrophoreseblätter bei pH 1,9 her. Aus jedem wurden 6 Papierstreifen, die die einzelnen Substanzen enthielten, ausgeschnitten, eluiert und der Hydrolyse unterworfen.

2.5 Ergebnis der Hydrolyse

Zur Analyse der Hydrolyseprodukte der Substanz G fertigten wir eine elektrophoretische Trennung bei pH 3,6 an. Zum Vergleich trugen wir zwei Gemische aus bekannten Aminosäuren auf.

Im anodischen Bereich wurde sichtbar: 1. Ein Band auf der Höhe von Cysteinsäure, 2. ein weiteres auf gleicher Höhe wie Glutaminsäure, 3. Wie der neutrale Block der Vergleichssubstanzen laufen zwei deutlich sichtbare Bänder, die aber durch die Trennung mit diesem Puffer nicht identifiziert werden konnten (Abb. 6).

Um diese beiden Bänder näher zu untersuchen, führten wir eine Elektrophorese bei pH 1,9 durch: Erneut war deutlich die Cysteinsäure nachweisbar; weiter fand sich eine ninhydrinpositive Substanz, die bei diesem Puffer zwischen Taurin und Tryptophan läuft; sie konnte keiner Aminosäure zugeordnet werden. Auf der Höhe von Glutaminsäure, Asparaginsäure und

Prolin war ein Band sichtbar. Nach der Analyse bei pH 3,6 ist dies wahrscheinlich Glutaminsäure. Klar konnten noch zwei Bänder identifiziert werden:

1. Ein Band auf der Höhe von Alanin
2. Eine Substanz, die sich bei diesem Puffer wie Glycin verhält (Abb. 7).

Da die Ausgangsmenge der fünf schwachen Bande so gering war, konnten wegen der Verluste bei der Hydrolyse durch die nachfolgenden Elektrophorese keine ninhydrinpositiven Spaltprodukte nachgewiesen werden (13). Die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit Phenolwasser brachte keine neue Information.

3. DISKUSSION

3.1 Methode

3.1.1 Vorteile der Anwendung von zwei verschiedenen Trennmethoden zur Isolierung einer Substanz

GRANZER (7) sowie GRASSMANN (8) beobachteten bei der elektrophoretischen Trennung von Aminosäure- und Peptidgemischen, nachdem ein Band eluiert und unter den gleichen Bedingungen nochmals aufgetrennt wurde, nicht nur das eluierte Peptid, sondern auch geringe Mengen anderer Aminosäuren und Peptide. GRANZER führte dieses Mitreißen auf Nebenvalenzbindungen zurück. Wir konnten das gleiche Phänomen beobachten: Nachdem aus 20 Streifen die Substanz G eluiert wurde, fand sich bei der Reelektrophorese zwar ein starkes Band im Bereich von G, außerdem aber noch zwei schwache Bänder: im Bereich der neutralen Aminosäuren und des Glutathions (Abb. 2). GRANZER schlug zur Vermeidung dieser Erscheinung den Zusatz von dissoziierenden Mitteln zur Pufferlösung vor. Man kann aber, wie vorliegende Arbeit zeigt, nach der elektrophoretischen Trennung eine Gelfiltration anschließen und dadurch die störenden Substanzen abtrennen. Dieses Vorgehen hat folgende Vorteile: 1. Keine Zusätze, die sich bei der späteren Verarbeitung störend bemerkbar machen oder die Substanzen verändern. 2. Durch die Gelfiltration gewinnt man eine zusätzliche Information: Abschätzung des Molekulargewichts (6).

3.1.2 Reihenfolge der angewandten Methoden

Bei der Verwendung von zwei verschiedenen Methoden wird als erster Schritt in den meisten Arbeiten die Gelfiltration angegeben (10). Dies bietet folgende Vorteile:

1. Mildere Trennbedingungen,
2. quantitative Wiedergewinnung des Materials,
3. es kann eine größere Extraktmenge in einem Analyseschritt bearbeitet werden.

Wird hingegen die Elektrophorese vor der Gelchromatographie durchgeführt, sind eine große Anzahl von Trennungen nötig (in unserem Beispiel 20), um eine ausreichende Substanzmenge zur Weiterverarbeitung zu gewinnen.

Ein großer Nachteil der Gelchromatographie ist aber, daß sich das Material in weniger deutliche Fraktionen aufteilt. Es gibt wenige vergleichbare Veröffentlichungen, in denen über Gesamtextrakte von Organen berichtet wird. Altaner (1) trennte Leberextrakte mit Sephadex G-25. Er erhielt dabei nur fünf deutlich getrennte Fraktionen, die sich alle elektrophoretisch in weitere ninhydrinpositive Fraktionen aufteilen ließen. Als weiterer Vorteil der Elektrophorese ergibt sich, daß der Abstand zwischen zwei Substanzen leicht durch die Laufzeit und angelegte Spannung verändert werden kann.
Die Schwierigkeiten, nur mit verschiedenen chromatographischen Methoden, ein Peptid aus einem Organextrakt zu isolieren, zeigt die Arbeit von B. Shome (15) über Peptide im Hypothalamus. Als letzter Trennungsschritt zur endgültigen Isolierung mußte auch hier die Hochspannungselektrophorese verwendet werden.

Donhauser (5) führte mit der trägerfreien Elektrophorese eine Vorfraktionierung durch und erreichte damit bei der folgenden Hochspannungselektrophorese eine bessere Trennqualität und konnte höhere Extraktkonzentrationen verwenden. Den gleichen Effekt könnte man mit einer vorherigen Gelchromatographie erreichen, da auch durch diese Methode störende Begleitfraktionen eliminiert werden.

3.1.3 Erklärung der Auftrennung des bei pH 3,6 einheitlichen Bandes in mehrere Einzelbänder durch die Elektrophorese pH 1,9

Die Elektrophorese des bei pH 3,6 einheitlichen Bandes mit dem Puffer pH 1,9 zeigte neben dem starken Band der Substanz G fünf weitere schwache Bänder. Bei dem stark sauren pH dieses Puffers findet wahrscheinlich eine partielle Hydrolyse statt. Darauf deutet besonders das Auftreten der Cysteinsäure unter diesen Bändern hin. Diese war im Vollextrakt nicht nachweisbar, fand sich aber in den Hydrolyseprodukten der Substanz G. Leider waren Glycin und Alanin in Abb. 5 bereits zur Kathode weggelaufen. Da es sich um eine Hydrolyse unter sehr milden Umständen handelte, fanden sich auch noch Bande, die später bei der eigentlichen Hydrolyse mit 6n-HCl zerstört oder umgewandelt wurden (16). Ein solches Umwandlungsprodukt könnte das Band sein, das sich nach der Hydrolyse zwischen Taurin und Tryptophan bei pH 1,9 befand (Abb. 7). Das Problem der Verunreinigung der zu isolierenden Substanz durch ninhydrinpositive Stoffe im Papier wurde von Schmück (14) in seiner Dissertationsschrift ausführlich behandelt.

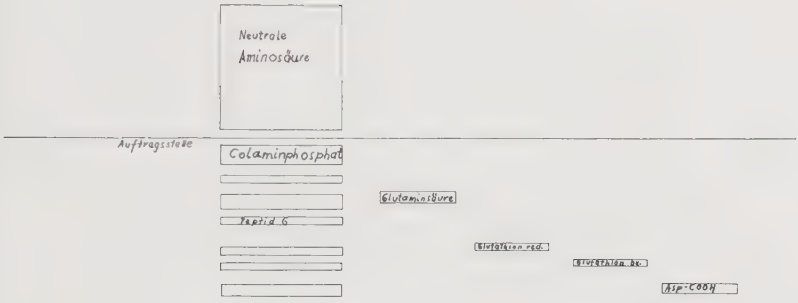
3.2 Diskussion des Ergebnisses

Donhauser (5) zeigte, daß im Herzmuskelextrakt des Kalbs bei der elektrophoretischen Auftrennung mit dem Puffer pH 3,9 sich eine hydrolysierbare und ninhydrinpositive Substanz zwischen Glutaminsäure und Glutathion befindet. Durch die Hydrolyse und die Analyse der Spaltprodukte konnte die Peptidnatur dieser Substanz von uns nachgewiesen werden.
Clotten fand, daß im Bereich der Substanz G bei pH 3,6 in der Hochspannungselektrophorese von Serum-Ultrafiltrat hauptsächlich ninhydrinpositive „schwefelhaltige Komplexe" laufen (4). Bei der Aufspaltung des Peptids wurde als sicherer schwefelhaltiger Bestandteil die Cysteinsäure von uns gefunden. Auch aus der Arbeit von Biserte ist zu ersehen, daß im Herzmuskelextrakt vor der Hydrolyse keine Cysteinsäure zu finden war, während sie nach der Hydrolyse deutlich sichtbar wurde (3).

4. ZUSAMMENFASSUNG

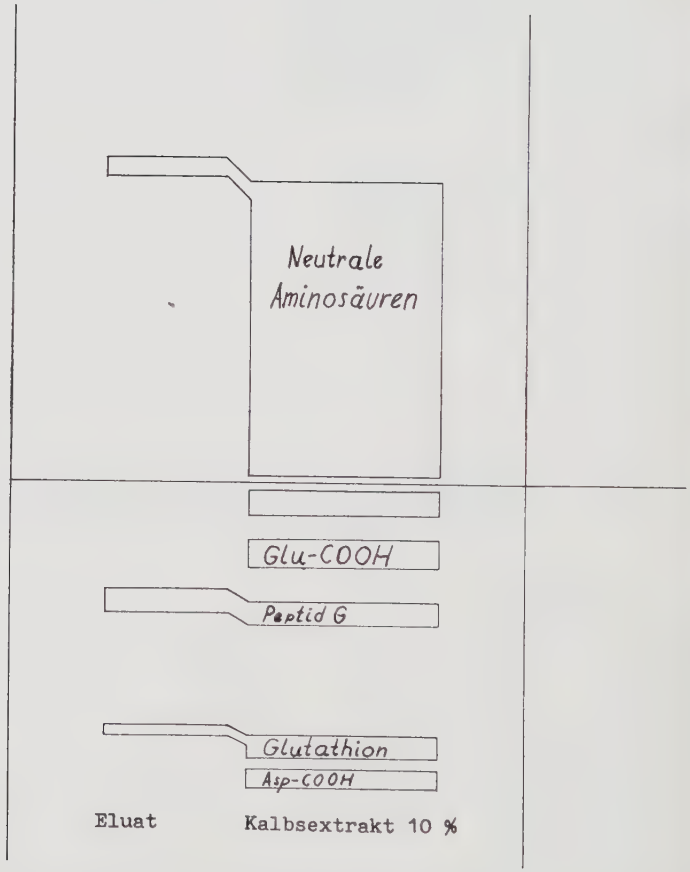
Es wird die Gewinnung eines Extrakts aus Kalbsmyocard beschrieben. Aus diesem isolierten wir mit Hilfe von Hochspannungselektrophorese und Gelchromatographie ein Peptid. Die Reinheitsüberprüfung des Peptids geschah hochspannungselektrophoretisch bei verschiedenen pH. Nach der sauren Hydrolyse konnte der größte Teil der Aminosäuren identifiziert werden – Glutaminsäure, Alanin, Glycin, Cysteinsäure.

Abb. 1



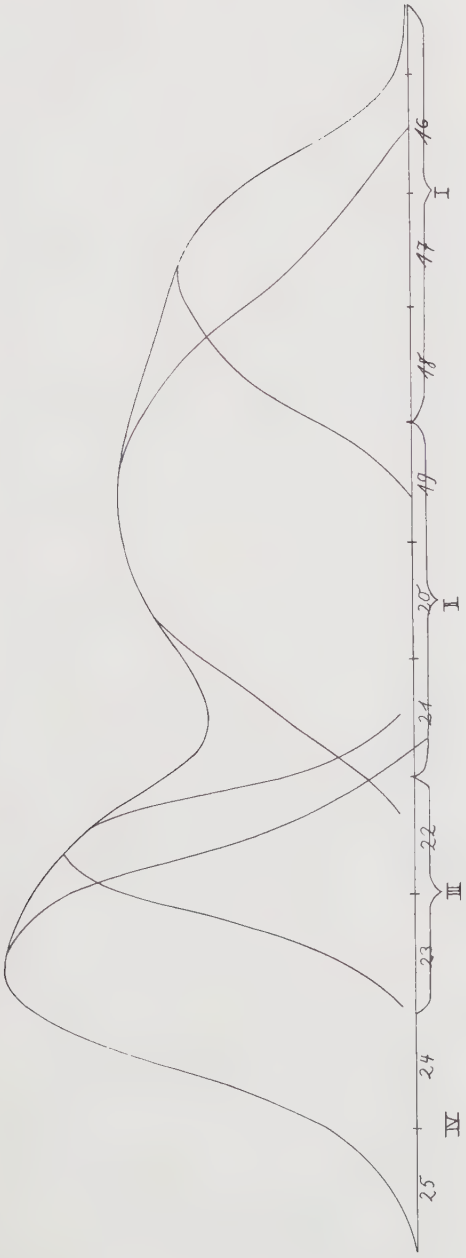
Ausschnitt aus einer elektrophoretischen Trennung bei pH 3,6 von 10 % Kalbsherzextrakt und bekannten ninhydrinpositiven Substanzen, die anodisch laufen

Abb. 2



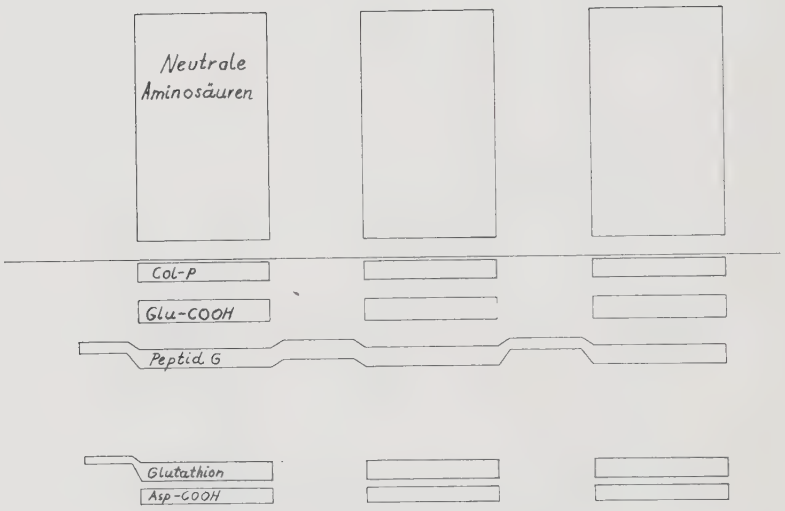
Eluat aus 20 Streifen, die durch eine Elektrophorese bei pH 3,6 entstanden sind, gefriergetrocknet. Zum Vergleich 10 % Kalbsextrakt

Abb. 1



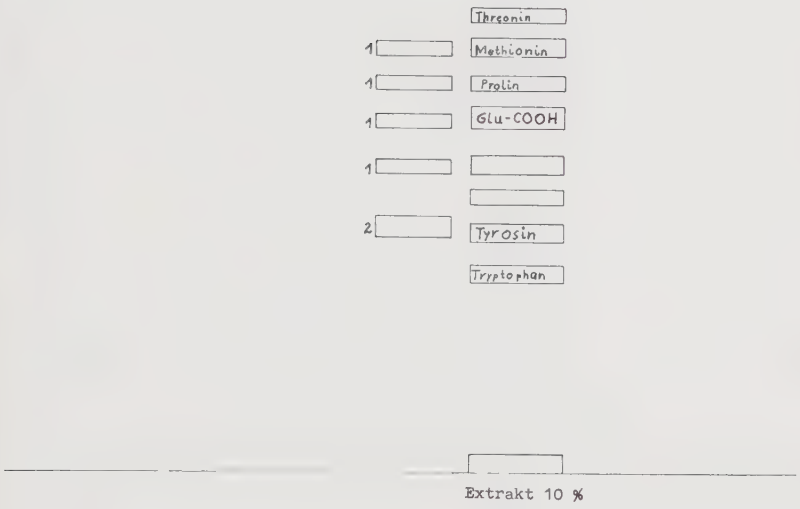
Gelfiltration
mit
Sephadex G 10
Aufgezeichnete
Kurve des
Durchlaufanaly-
sators
X-Achse-Nr. der
Gläschen im
Fraktionssammler
Y-Achse -
Extinktion

Abb. 4



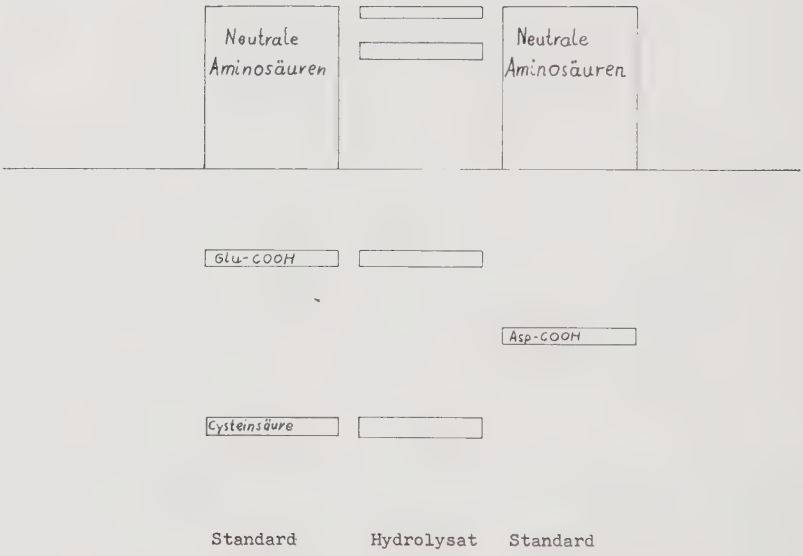
Überprüfung der Fraktionsgruppen, gewonnen durch Gelfiltration Sephadex G-10 und anschließender Gefriertrocknung (Elektrophorese pH 3,6)

Abb. 5



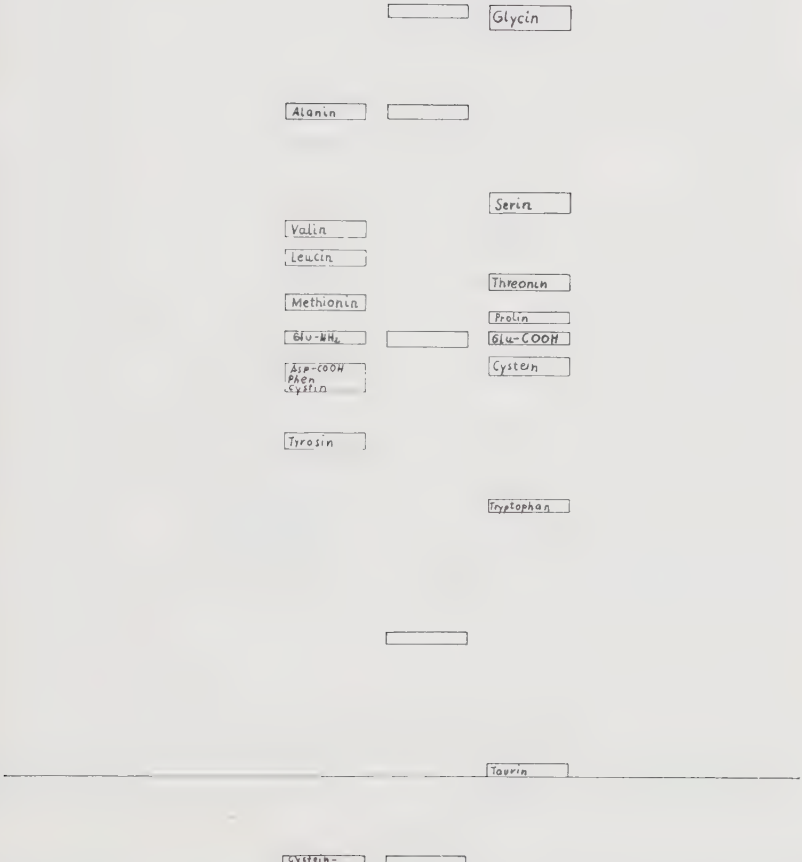
Fraktionsgruppe 19 bis 21, die sich bei pH 3,6 als ein sehr starkes einheitliches Band darstellt, im Kontrollauf bei pH 1,9. Die mit 1 bezeichneten Bänder waren sehr schwach, das mit 2 bezeichnete Band war sehr stark.

Abb. 6



Ergebnis der Hydrolyse der Substanz G (Elektrophorese bei pH 3,6)

Abb. 7



Ergebnis der Hydrolyse der Substanz G (Elektrophorese bei pH 1,9)

LITERATUR

1. Altaner, C. (1962). Fractionation of the Liver Extract on Sephadex G-25. Experientia, 18, 568–569.

2. Atfield, G. N., Morris, C. J. O. (1961). Analytical Separations by High-Voltage Paper Electrophoresis, Amino Acids in Protein Hydrolysates. The Biochemical Journal, 81, 606–614.

3. Biserte, G., Boulanger, P., Paysant, P. (1958). Chromatographie sur Papier des Milieux Biologiques. Bull. soc. chim. biol., 2067–2089.

4. Clotten, R., Clotten, A. (1962). Hochspannungselektrophorese, Thieme Stuttgart.

5. Donhauser, S. (1968). Über hydrolysierbare ninhydrinpositive Bestandteile des Myocards. Dissertation München.

6. Flodin, P. (1962). Dextran Gels and their Applications in Gel Filtration. Uppsala.

7. Granzer, E. (1958). Eine Methode zur Verbesserung der elektrophoretischen Trennung von Proteinen und Peptiden. Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 311, 46–370.

8. Grassmann, W., Strobel, R., Hannig, K., Deffner-Plöckl, M. (1956). Zur Konstitution des Insulins. Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 305, 21–307.

9. Kothny, K. (1968). Hochspannungselektrophoretische Untersuchungen der freien Aminosäuren des Kalbsherzens. Dissertation München.

10. Porath, J., Schally, A. V. (1962). Gel Filtration of Posterior Pituitary Hormones. Endocrinology 70. 738–742.

11. Porath, J. (1960). Gel Filtration of Peptides and Amino Acids. Biochim. Biophys. Acta 39. 193–207.

12. Pataki, G. (1966). Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie. Walter de Gruyter & Co. Berlin.

13. Rees, M. W. (1946). The Estimation of Threonine and Serine in Proteins. The Biochemical Journal, 40, 632–639.

14. Schmück, H. (1971). Dissertation München.

15. Shome, B., Saffran, M. (1966). Peptides of the Hypothalamus. J. Neurochem. 13. 433–448.

LEBENSLAUF (Reinhard Bubl)

17. 1. 1942	Geburt in Wallern (Böhmerwald)
1946	Vertreibung
1948–1952	Volksschule in Simbach/Inn
1952–1962	Oberrealschule in Simbach/Inn
1962	Abitur
1962–1963	Studium an der TH München, Mathematik und Physik
1963–1970	Medizinstudium an der Universität München
1970	Staatsexamen
1970–1971	Medizinalassistent in Trostberg, Regensburg und Mühldorf/Inn
1972	Wehrdienst
1972	Assistenzarzt in der St. Hedwigsklinik in Regensburg

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Nowy für die Überlassung des Themas und für sein Interesse, das er der Arbeit gewidmet hat. Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Seitz, daß ich in seiner Klinik die Versuche durchführen durfte.